

(19) BUNDESREPUBLIK

DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

(12) Offenlegungsschrift

(11) DE 3715984 A1

(51) Int. Cl. 4:

G 01 N 33/535

G.01 N 33/577

// C07K 15/04,15/06

Deutsche Agentur
für
Patent und
Marktamt

DE 3715984 A1

(30) Unionspriorität: (32) (33) (31)

13.05.86 JP P 109831/86

(71) Anmelder:

Sanyo Chemical Industries, Ltd., Kyoto, JP

(74) Vertreter:

Deufel, P., Dipl.-Chem.Dipl.-Wirtsch.-Ing.Dr.rer.nat;
Schön, A., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.; Hertel, W.,
Dipl.-Phys.; Lewald, D., Dipl.-Ing.; Otto, D., Dipl.-Ing.
Dr.-Ing., Pat.-Anw., 8000 München

(72) Erfinder:

Tanaka, Yasuhiko; Sugiura, Masakazu; Sakata,
Kazuto, Kyoto, JP

(54) Enzym-Immunoassay

Es wird ein Enzym-Immunoassay zur Bestimmung eines Antigens mit verbesserter Empfindlichkeit bereitgestellt. Dieses Immunoassay weist folgende Reaktionsstufen auf

(1) Reaktion

(A) eines Immunkomplexes, der dadurch erhalten wurde, daß gleichzeitig eine antigene Substanz (a), ein immobilisierter erster Antikörper (b), der die antigene Substanz erkennt, und ein zweiter Antikörper (c), der die antigene Substanz erkennt und von einer anderen Tierart stammt, umgesetzt werden,

mit

(B) einem enzymmarkierten dritten Antikörper, der das Immunoglobulin erkennt, welches von der gleichen Tierart wie der zweite Antikörper stammt,

(2) Trennen der festen Phase von der flüssigen, und

(3) Bestimmung der Menge des in der festen Phase vorliegenden Enzyms mittels der Enzymaktivität.

DE 3715984 A1

Patentansprüche

1. Enzym-Immunoassay zur quantitativen Bestimmung einer antigenen Substanz, gekennzeichnet durch folgende Reaktionsstufen:

5

(1) Reaktion

10

- (A) eines Immunkomplexes, der dadurch erhalten wurde, daß gleichzeitig eine antigene Substanz (a), ein immobilisierter erster Antikörper (b), der die antigenen Substanz erkennt, und ein zweiter Antikörper (c), der die antigenen Substanz erkennt und von einer anderen Tierart stammt, umgesetzt werden, mit
- (B) einem enzymmarkierten dritten Antikörper, der das Immunoglobulin erkennt, welches von den gleichen Tierarten wie der zweite Antikörper stammt,

15

- (2) Trennen der festen Phase von der flüssigen, und (3) Bestimmung der Menge des in der festen Phase vorliegenden Enzyms mittels der Enzymaktivität.

20

2. Enzym-Immunoassay nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der dritte Antikörper von der gleichen Tierart wie der erste Antikörper stammt.
3. Enzym-Immunoassay nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß der erste Antikörper auf einem anorganischen oder organischen Träger immobilisiert ist.
4. Enzym-Immunoassay nach Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß der zweite Antikörper ein monoklonaler Antikörper ist.

Beschreibung

25

Die Erfindung betrifft ein Enzym-Immunoassay (EIA).

Als eine EIA-Technik ist die Sandwich-EIA-Methode bekannt. Diese Technik enthält die Reaktion eines an einen immobilisierten ersten Antikörper gebundenen Antigens mit einem enzymmarkierten zweiten Antikörper und die anschließende Bestimmung der Menge dieses Enzyms (US-PS 44 74 878).

30

Diese Technik hat jedoch den Nachteil, daß eine ausreichende Empfindlichkeit bei einem geringen Titer des zweiten Antikörpers nicht erzielt wird.

Der Erfindung liegt demnach die Aufgabe zugrunde, ein EIA mit einer verbesserten Empfindlichkeit bereitzustellen.

35

Eine andere Aufgabe dieser Erfindung ist die Bereitstellung eines EIA mit einer hohen Empfindlichkeit auch für den Fall, daß der Titer des zweiten Antikörpers gering ist. Weiterhin ist es Aufgabe der Erfindung, ein EIA zur Verfügung zu stellen, welches in der Lage ist, einen ungereinigten Antikörper als zweiten Antikörper mit einer ausreichend hohen Empfindlichkeit zu verwenden.

Schließlich ist es Aufgabe der Erfindung, ein EIA bereitzustellen, welches hochspezifisch die Bestimmung eines Antigens ermöglicht.

40

Diese Aufgabe wird durch das EIA gemäß Patentanspruch 1 gelöst. Diese und weitere Gegenstände der vorliegenden Erfindung, die nachfolgend noch verdeutlicht werden, wurden weitestgehend durch ein Enzymimmunoassay-Verfahren zur quantitativen Bestimmung antigener Substanzen erreicht, es enthält folgende Verfahrensstufen:

45

1. Reaktion

- (A) eines Immunkomplexes, erhalten durch gleichzeitige Umsetzung von (a) einer antigenen Substanz, (b) eines immobilisierten ersten Antikörpers, welcher die antigenen Substanz erkennt, und (c) eines zweiten Antikörpers, welcher die antigenen Substanz erkennt und von einer anderen Tierart stammt, mit
- (B) einem enzymmarkierten dritten Antikörper, welcher das Immunoglobulin, das von den gleichen Tierarten wie der zweite Antikörper stammt, erkennt,

50

2. Trennung einer festen Phase von einer flüssigen, und

3. Bestimmung der Menge dieses in der festen Phase vorhandenen Enzyms mit Hilfe der Enzymaktivität.

55

Die Fig. 1, 2, 3, 4, 5 und 6 sind EIA-Standardkurven, jeweils erhalten aus Beispiel 1, Vergleichsbeispiel 1, Vergleichsbeispiel 2, Beispiel 2, Vergleichsbeispiel 3 und Vergleichsbeispiel 4.

Erläuternde Beispiele zu verwendender geeigneter antigener Substanzen in der vorliegenden Erfindung sind

60

1) Hormone, wie Insulin, die Beta-Untereinheit des Human-Choriongonadotropin (HCG-Beta), Wachstumshormon, Thyrotropin (TSH), Thyroxin, Trijodthyronin und ähnliche,

2) Serumproteine, wie IgG, IgA, IgM, IgE, Alpha-Fetoprotein, Beta₂-Mikroglobulin, TBG und ähnliche,

3) tumorassoziierte Antigene wie Carcinoembryonic Antigen (CEA), Ferritin, POA, CA-19-9, CA125, und ähnliche, und

65

4) Krankheitserreger (pathogene Bakterien, Viren, Parasiten oder Protozoen, die verschiedene Krankheiten verursachen), wie Streptokokken, Hepatitisviren (wie Hepatitis-B Virus), Rubella-Virus, Herpes-Virus, Toxoplasma Gondii, Malaria-parasiten und ähnliche.

Unter diesen Antigenen werden HCG-Beta, TSH, CEA und Hepatitis-B-Virus unter Berücksichtigung ihrer

hohen Empfindlichkeit bevorzugt.

Geeignete erste Antikörper, die in dieser Erfindung anwendbar sind, sind polyclonale und monoklonale Antikörper. Polyclonale Antikörper können dadurch erhalten werden, daß ein Säugetier (wie Hase, Huhn, Schaf, Meerschweinchen und ähnliche) mit einem Antigen immunisiert werden. Zur Verwendung im erfundungsgemäß beschriebenen Verfahren nützliche monoklonale Antikörper können durch bekannte Verfahren, wie in Nature 256, 495-497 beschrieben, beispielsweise erhalten werden. Grundsätzlich enthalten sie die Injektion eines Immunogens in eine Maus oder ein anderes geeignetes Tier, Fusion Antikörper produzierender Zellen des Tieres mit Myelomazellen (die von einer Maus oder einem anderen geeigneten Tier stammen), und Kultivieren oder über Aszites Stimulieren der sich ergebenden Hybridoma- oder Hybridzellen. Diese Antikörper können durch bekannte Verfahren gereinigt werden, wie Ammoniumsulfatfällung, DEAE-Cellulosechromatographie, Affinitätschromatographie und ähnliche.

Dieser erste Antikörper kann erfundungsgemäß auf einem anorganischen oder organischen Träger (unlösliches Festmaterial) immobilisiert werden.

Geeignete Träger sind anorganische Träger, beispielsweise kieselsäurehaltige Materialien (wie Glas (poröses Glas, mattiertes Glas und ähnliche), Siliziumdioxid (Silicagel, kolloidale Kieselsäure), Bentonit, Wollastonit, Cordierit und ähnliche) und nicht-kieselsäureartige Metalloxide (wie Aluminiumoxid, Spinell, Apatit, Hydroxyapatit, Titanoxid, Zirkonoxid und magnetische Verbindungen (wie Eisenoxide, Ferrite, Nickeloxide, Kobaltoxide und ähnliche)), und organische Träger, beispielsweise Kunststoffe (wie Polystyrol und seine Derivate wie Poly(aminostyrol), Acrylpolymeren, wie Polyacrylonitril, Polymethacrylate, wie Polymethylmethacrylat, Polyolefine, wie Polyethylen, Polypropylen, Polybutylen und Polybutadien, halogenenthaltende Polymere, wie Poly(vinylchlorid) und Poly(vinylidenchlorid), Polyester, wie Poly(ethylenenterephthalat), Polyamide, wie Nylon 6 und Nylon 6,6, und ähnliche), natürlich Polymere, wie Polysaccharide, Cellulose, Dextran, Agarose, Papier (z.B. Filterpapier), Polypeptide, Collagen und ähnliches.

Diese Träger können natürlich teilchenförmig sein und von einem fein zerteilten Pulver bis zu einem grobkörnigen Material variieren (beispielsweise etwa 20 bis etwa 100 mesh oder mehr, U.S. Standardsieb) oder können ein geformter Gegenstand wie ein Blatt oder Pellet oder dreidimensionale Gegenstände, wie Hohlkugelchen, Teströrchen, Schalen, Scheiben usw. sein. Von diesen werden Glas (insbesondere Glaskugelchen und Glas-teströrchen) und Kunststoffe (Kunststoffrörchen und Kunststoffschalen) bevorzugt. Diese Träger können porös oder durch bekannte Methoden, wie Ätzen oder Mattieren, chemische Behandlung, chemisches Überziehen und ähnliches oberflächenverändert sein.

Der Antikörper kann durch bekannte Mittel immobilisiert werden, welche von einfacher Adsorption bis zu chemischer Bindung variiert werden können. Chemische Kupplung beinhaltet typischerweise die Behandlung des Trägers mit einer oder mehreren chemischen Verbindungen (Silane, Polyisocyanate und ähnliche) gefolgt durch Kontaktieren des behandelten Trägers mit einer wäßrigen Lösung des Antikörpers. Die Adsorption erfolgt gewöhnlich derart, daß man eine wäßrige Lösung des Antikörpers, der immobilisiert werden soll, ausreichend lange mit einem Träger in Berührung bringt, so daß der gewünschte maximale Grad der Immobilisierung erzielt wird. Geeignete Beispiele und Verfahren zur Immobilisierung eines Antikörpers sind solche, bei denen eine physikalische Adsorption oder chemische Bindung an Glas mit einem Silankupplungsmittel und mit oder ohne ein Vernetzungsmittel, erfolgt, wie in der US-PS 42 80 992 beschrieben, und solche, durch physikalische Adsorption an Kunststoffe, wie in E. Engvall, J. Johnson, P. Parlman, Biochim. Biophys. Acta, 251 (1971) 427-434 beschrieben.

Beispiele geeigneter zweiter Antikörper sind:

- 1) polyclonale Antikörper, die das Antigen erkennen und von einer Tierart stammen, die von der des ersten Antikörpers verschieden ist (beispielsweise Antikörper, die vom Huhn, Schaf, Meerschweinchen und ähnlichen stammen (wenn der erste Antikörper vom Kaninchen stammt), und Antikörper vom Kaninchen, Huhn, Meerschweinchen und ähnlichen (wenn der erste Antikörper vom Schaf stammt)), und
- 2) monoklonale Antikörper, hergestellt durch Kultivieren oder über Aszites Stimulieren der sich ergebenden Hybridoma oder Hybridzellen, die durch Fusion von Zellen erhalten werden, die gegen das Antigen Antikörper produzieren, (beispielsweise von einer Maus) mit Myelomazellen (von einer Maus), in dem Falle, wo der erste Antikörper ein polyclonaler Antikörper ist, der das Antigen erkennt und von einem Tier stammt (welches ein anderes als eine Maus ist).

Geeignete Formen eines zweiten Antikörpers sind beispielsweise Antisera, Hybridomakulturflüssigkeiten und Ascitesflüssigkeit ebenso wie durch Reinigung erhaltene Immunoglobuline.

Die Konzentration des Immunoglobulins, die im zweiten Bereich gemäß der Konzentration des Antigens in der zu prüfenden Probe und der Konzentration des enzymmarkierten dritten Antikörpers schwanken kann, beträgt im allgemeinen von etwa 0,1 bis etwa 1000 µg/ml, vorzugsweise von etwa 1 bis etwa 200 µg/ml.

Diese Immunkomplexe können erfundungsgemäß durch Reaktion des immobilisierten ersten Antikörpers, der antigenen Substanz und dem dritten Antikörper zur gleichen Zeit erhalten werden. Es werden beispielsweise ein erster, an einen unlöslichen Träger gebundenen Antikörper, eine Antigen enthaltene Probe, die zu testen ist, und eine einen zweiten Antikörper enthaltende Pufferlösung gleichzeitig zur Bildung eines Immunkomplexes inkubiert. Die Inkubation wird unter herkömmlichen Bedingungen, beispielsweise 5 bis 50°C, vorzugsweise 34 bis 40°C 5 Minuten bis 2 Tage lang, vorzugsweise 5 bis 30 Minuten lang, durchgeführt.

Nach der Inkubation können die nicht umgesetzten Stoffe aus dem erhaltenen Immunkomplex in üblicher Weise ausgewaschen werden. Es werden beispielsweise 1 bis 5 ml einer Waschflüssigkeit (wie destilliertes Wasser, physiologische Kochsalzlösung, Phosphatpuffer oder ähnliche) zu der inkubierten Mischung hinzugegeben und die Flüssigkeit durch Absaugen mit einer Wasserstrahlpumpe entfernt. Dieser Vorgang wird mehrere

Male wiederholt (beispielsweise zwei- bis fünfmal), um einen von nicht umgesetzten Stoffen getrennten Immunkomplex zu erhalten.

Beispiele dritter geeigneter Antikörper sind solche Antikörper, die Immunglobuline, die aus den gleichen Tierarten wie der zweite Antikörper stammen, erkennen: Beispielsweise Anti-Kaninchenimmunoglobulin-Antikörper (Meerschweinchen) in dem Fall, wo der zweite Antikörper vom Kaninchen stammt, Anti-Huhnimmunoglobulin-Antikörper (Maus) in dem Fall, wo der zweite Antikörper vom Huhn stammt, und Anti-Mausimmunoglobulin-Antikörper (Kaninchen) in dem Fall, wo der zweite Antikörper von der Maus stammt.

Hinsichtlich der Kombinationen der ersten, zweiten und dritten Antikörper wird bevorzugt, wegen einer geringeren unspezifischen Bindung, einen dritten Antikörper zu verwenden, der von der gleichen Tierart wie der erste Antikörper stammt. Erläuternde Beispiele der Kombinationen der ersten, zweiten und dritten Antikörper sind:

- (1) der erste Antikörper vom Kaninchen, der zweiten monoklonale Antikörper von der Maus und der dritte Antikörper vom Kaninchen,
- (2) der ersten Antikörper vom Meerschweinchen, der zweite Antikörper vom Schaf und der dritte Antikörper vom Meerschweinchen,
- (3) der ersten Antikörper vom Schaf, der zweite Antikörper vom Kaninchen und der dritte Antikörper vom Schaf, und
- (4) der erste Antikörper vom Huhn, der zweite monoklonale Antikörper von der Maus und der dritte Antikörper vom Huhn.

Unter diesen werden die Beispiele (1) und (4) wegen ihrer höheren Spezifität gegen das Antigen bevorzugt. Geeignete Enzyme zur Markierung des dritten Antikörpers sind Peroxidase, alkalische Phosphatase, Beta-Galactosidase und ähnliche. Unter diesen wird die Peroxidase, die eine leichte Markierbarkeit des Antikörpers und eine hohe Empfindlichkeit aufweist, am meisten bevorzugt.

Die Markierung des dritten Antikörpers kann durch bekannte Methoden, beispielsweise solcher, wie in S. Yoshitake, M. Imagawa, E. Ishikawa, et al, J. Biochem. 92 (1982) 1413—1424 beschrieben, durchgeführt werden.

Die Reaktion des enzymmarkierten Antikörpers mit dem Immunkomplex, der durch gleichzeitige erfundsgemäße Reaktion erhalten wurde, kann in herkömmlicher Weise durchgeführt werden. So wird z. B. der Immunkomplex in 100 bis 1000 µl einer den enzymmarkierten Antikörper enthaltenden Lösung hinzugegeben, dann erfolgt eine Inkubation dieser Mischung. Die Inkubation kann unter gewöhnlichen Bedingungen durchgeführt werden; beispielsweise bei 5 bis 50°C, vorzugsweise 34 bis 40°C 5 Minuten bis 2 Tage, vorzugsweise 5 bis 30 Minuten lang.

Das Reaktionsprodukt aus dem Immunkomplex und dem enzymmarkierten Antikörper kann mit einer Waschlösung (wie destilliertes Wasser, physiologische Salzlösung, Phosphatpuffer und ähnlichen) gewaschen werden. Nach dem Waschen wird das Produkt in 100 bis 1000 µl eines Substrates (wie 5-Amino-salicylsäure, o-Phenyldiamin, 2,2'-Azinodi(3-ethylbenzthiazolin)-6'-sulfonsäure (ABTS) oder ähnliche, vorzugsweise o-Phenyldiamin), eingebracht und anschließend inkubiert. Die Inkubation kann unter üblichen Bedingungen, beispielsweise 5 bis 50°C, vorzugsweise 30 bis 40°C 5 Minuten bis 1 Stunde lang, vorzugsweise 5 bis 30 Minuten lang ausgeführt werden. Nach der Inkubation wird die Reaktion durch Hinzugabe von 1 bis 10 ml einer Lösung wie Schwefelsäure, Chlorwasserstoffsäure oder ähnlichem zu der Inkubationsmischung beendet. Das so erhaltene Produkt wird zur Bestimmung der Enzymaktivität verwendet.

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfundung.

45 Beispiel 1 (Bestimmung von CEA)

a) Herstellung der Human-CEA-Standardlösung

Die Konzentration einer hoch konzentrierten CEA-Lösung, erhalten von einem metastasierendem Darmtumor durch Perchlorsäureextraktion, wurde unter Verwendung des CEA International Reference Standard (63/701) der WHO und eines CEA-Bestimmungskit (CEA-EIA, hergestellt durch DAINABOT) bestimmt. Die Lösung wurde mit einem 0,02 M Phosphatpuffer derart verdünnt, daß jeweils Standardlösungen mit 5, 10, 30 und 60 ng/ml erhalten wurden.

55 b) Herstellung des Anti-CEA-monoklonalen Antikörpers

Eine Maus(Balb/c) wurde durch Injektion einer hochkonzentrierten Human-CEA-Lösung immunisiert. Nach 6 Wochen wurde aus der Milz eine Zellsuspension hergestellt und anschließend etwa 1×10^8 Milzzellen und etwa 2×10^7 Mausmyelomazellen unter PEG-Behandlung fusioniert. Die erhaltenen fusionierten Zellen wurden in einem HAT-Medium kultiviert, und anschließend einem Screening unterworfen, um die Antikörper produzierenden Zellen (Hybridoma) zu selektieren. Danach werden die Hybridomazellen durch Klonieren als Monoklon angezüchtet und anschließend werden die Monoklone über Aszites einer Maus stimuliert. Die erhaltene Aszitesflüssigkeit wird gereinigt, um ein monoklonales CEA-Immunoglobulin zu gewinnen.

65 c) Herstellung des peroxidasemarkierten Anti-Maus-Immunoglobulinantikörpers

Ein Anti-Mausimmunoglobulin-Antikörper (hergestellt durch Dako) wurde mit Peroxidase gemäß der im J. Biochem. 92 (1982), 1413—1424 beschriebenen Methode kombiniert und nachfolgend wird die erhaltene Lösung

1/10—1/5000 mit einem 1% Rinderserumalbumin enthaltenden Puffer verdünnt.

d) Herstellung der mit Anti-CEA-polyklonalen Antikörpern überzogenen Glaskügelchen

Anti-CEA polyclonale Kaninchenantikörper (hergestellt von Dako) wurden auf der Oberfläche von Glashohlkügelchen nach dem Verfahren der US-PS 36 52 761 aufgezogen. 5

e) Quantitative Bestimmung des Human-CEA

Ein Glashohlkügelchen, überzogen mit Kaninchen-anti-CEA-polyklonalen Antikörpern, und 50 µg einer 60 ng/ml Human CEA-Standardlösung wurden 15 Minuten lang bei 37°C in 300 µl einer 0,02 M Phosphatpuffe, 10 enthaltend 10 bis 100 µg/ml des anti-CEA monoclonalen Antikörpers in einem Teströhrchen inkubiert. Danach erfolgt das Waschen des Hohlkügelchens mit destilliertem Wasser. Das Hohlkügelchen wird in 300 µl einer peroxidasemarkierten Anti-Mausimmunoglobulin-Antikörperlösung gegeben und anschließend 15 Minuten lang bei 37°C inkubiert. Nach dem Waschen des Hohlkügelchens mit destilliertem Wasser, wird dieses 15 Minuten lang bei 37°C in 400 µl einer Substratlösung (p-Phenylenediaminlösung, die Wasserstoffperoxid enthält) inkubiert. Anschließend wird die Reaktion durch Hinzufügen von 3 ml einer 1,5 N Schwefelsäure beendet. Die Absorption der erhaltenen Lösung wird bei 492 nm zur Bestimmung der Enzymaktivität des am Hohlkügelchen gebundenen Enzyms gemessen. 15

Die Enzymaktivitäten im Falle der Human-CEA Standardlösungen von 30, 10,5 und 0 ng/ml wurden jeweils in der gleichen Weise bestimmt, um eine Standardkurve zur Bestimmung des Human CEA, wie in Fig. 1 gezeigt, 20 aufzustellen.

Die Ergebnisse der Bestimmung des Human-CEA werden in Tabelle 1 gezeigt.

Vergleichsbeispiel 1 (Bestimmung des CEA durch die Sandwich-Methode) 25

a) Herstellung der Human-CEA-Standardlösung

Beispiel 1, a) wurde wiederholt.

b) Herstellung des anti-CEA monoclonalen Immunoglobulins 30

Beispiel 1, b) wurde wiederholt.

c) Herstellung des peroxidasemarkierten anti-CEA monoclonalen Immunoglobulins 35

Das oben erwähnte anti-CEA monoclonale Immunoglobulin wurde mit Peroxidase in der gleichen Weise gekoppelt, wie in Beispiel 1, c) beschrieben. Nachfolgend wird die erhaltene Lösung 1/10—1/5000 mit einem 1% Rinderserumalbumin enthaltenden Puffer verdünnt.

d) Herstellung der mit anti-CEA polyclonalen Antikörpern überzogenen Glashohlkügelchen 40

Beispiel 1, d) wurde wiederholt.

e) Quantitative Bestimmung des Human-CEA 45

Ein mit anti-CEA polyclonalen Kaninchenantikörpern überzogenes Glashohlkügelchen und 50 µl einer 60 ng/ml Human-CEA Standardlösung wurden 15 Minuten lang bei 37°C mit 200 µl eines 0,02 M Phosphatpuffers in einem Teströhrchen inkubiert, anschließend wird das Hohlkügelchen mit destilliertem Wasser gewaschen. Das Hohlkügelchen wurde in 300 µl der Peroxidase markierten anti-CEA monoclonal Immunoglobulinlösung eingebracht und anschließend 15 Minuten lang bei 37°C inkubiert. Nach weiterem Waschen des Hohlkügelchens mit destilliertem Wasser wurde dieses 15 Minuten lang bei 37°C in 400 µl einer Substratlösung (o-Phenylenediaminlösung, die Wasserstoffperoxid enthält) inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Hinzufügen von 3 ml einer 1,5 N Schwefelsäure beendet. Die Absorption der erhaltenen Lösung wurde zur Bestimmung der Enzymaktivität des an das Hohlkügelchen gebundenen Enzyms bei 492 nm gemessen. 50

Die Enzymaktivitäten im Falle der Human-CEA Standardlösungen von jeweils 30m, 10,5 und 0 ng/ml wurden in der gleichen Weise gemessen, um eine Standardkurve zur Bestimmung des human CEA, wie in Fig. 2 gezeigt, 55 zu erstellen.

Die Ergebnisse der Human-CEA Bestimmung werden in Tabelle 1 gezeigt.

Vergleichsbeispiel 2 (Bestimmung der CEA durch ein Verfahren aufeinanderfolgender Reaktionen) 60

a) Herstellung der Human-CEA-Standardlösung

Beispiel 1, a) wurde wiederholt. 65

b) Herstellung des Anti-CEA monoclonal Immunoglobulins

Beispiel 1, b) wurde wiederholt.

5 c) Herstellung des peroxidasemarkierten anti-CEA monoclonal Immunoglobulins

Beispiel 1, c) wurde wiederholt.

10 d) Herstellung der mit anti-CEA polyclonalen Antikörpern überzogenen Glashohlkügelchen

Beispiel 1, d) wurde wiederholt.

15 e) Quantitative Bestimmung des Human-CEA

15 Ein mit Kaninchen anti-CEA polyclonalen Antikörpern überzogenes Glashohlkügelchen und 50 µl einer 60 ng/ml Human-CEA Standardlösung wurden 15 Minuten lang bei 37°C mit 300 µl eines 0,02 M Phosphatpuffers in einem Teströhrchen inkubiert und anschließend wurde das Hohlkügelchen mit destilliertem Wasser gewaschen. Das Hohlkügelchen wurde dann in 300 µl 0,02 M Phosphatpuffer, enthaltend 10 bis 100 µg/ml des anti-CEA monoclonalen Antikörpers, eingebracht und anschließend 15 Minuten lang bei 37°C inkubiert. Nach 20 dem Waschen des Hohlkügelchens mit destilliertem Wasser wurde dieses in 300 µl der peroxidasemarkierten anti-CEA monoclonal Immunoglobulinlösung eingebracht und anschließend 15 Minuten lang bei 37°C inkubiert. Nach weiterem Waschen des Hohlkügelchens mit destilliertem Wasser wurde dieses in 400 µl einer Substratlösung (*o*-Phenyldiaminlösung, die Wasserstoffsuperoxid enthält) inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Hinzufügen von 3 ml 1,5 N Schwefelsäure beendet. Die Absorption der erhaltenen Lösung zur Bestimmung der Enzymaktivität des an das Hohlkügelchen gebundenen Enzyms wurde bei 492 nm gemessen.

25 Die Enzymaktivitäten im Falle der Human-CEA Standardlösungen mit jeweils 30, 10, 5 und 0 ng/ml wurden in der gleichen Weise gemessen, um eine Standardkurve zur Bestimmung des Human-CEA, wie in Fig. 3 gezeigt, zu erstellen. Die Ergebnisse der Bestimmung des Human-CEA werden in Tabelle 1 gezeigt.

30

Tabelle 1

	Empfindlichkeit ng/ml	Testbereich ng/ml	Präzision ng/ml (Variationskoeffizient, %)	ng/ml (Variationskoeffizient, %)
35 Beispiel 1	1,0	0–60	5,0 ± 0,4 (8,0%)	38,2 ± 2,2 (5,8%)
40 Vergleichsbeispiel 1	4,5	0–60	5,3 ± 0,9 (17,0%)	37,5 ± 5,3 (14,1%)
Vergleichsbeispiel 2	3,9	0–60	6,6 ± 0,9 (13,6%)	40,2 ± 5,8 (14,4%)

45

Beispiel 2 (TSH-Bestimmung)

a) Herstellung der Human-TSH Standardlösung

50 Human TSH (50 µg/Gefäß), erhalten von UCB Bioproducts, wurde mit 0,02 M Phosphatpuffer verdünnt, um Standardlösungen mit jeweils 50, 25, 2,5 und 0 IU/ml zu erhalten.

b) Herstellung des Anti-TSH monoclonalen Antikörpers

55 Beispiel 1, b) wurde wiederholt, mit der Ausnahme, daß anstelle des Human-CEA ein Human-TSH verwendet wurde, um einen anti-TSH monoclonalen Antikörper zu erhalten.

c) Herstellung der mit anti-TSH polyclonalen Antikörpern überzogenen Glashohlkügelchens

60 Beispiel 1, d) wurde wiederholt, mit der Ausnahme, daß Anti-TSH polyclonale Kaninchenantikörper (hergestellt von Dako) anstelle der anti-CEA polyclonalen Kaninchenantikörper verwendet wurden.

d) Quantitative Bestimmung des Human-TSH

65 Ein mit anti-TSH polyclonalen Kaninchenantikörpern überzogenes Glashohlkügelchen und 100 µl einer 50 IU/ml Human-TSH Standardlösung werden 30 bis 60 Minuten lang bei 37°C mit 200 µl eines 0,02 M Phosphatpuffers, der 10 bis 100 µg/ml anti-TSH monoclonalen Antikörpers enthält, in einem Teströhrchen inkubiert. Anschließend wird das Hohlkügelchen mit destilliertem Wasser gewaschen. Dann wird das Hohlkügel-

chen in 300 µl einer Lösung eines peroxidasemarkierten anti-Mausimmunoglobulin-Antikörpers, hergestellt gemäß Beispiel 1c), eingebracht und 30 bis 60 Minuten lang bei 37°C inkubiert. Nach einem weiteren Waschen des Hohlkügelchens mit destilliertem Wasser wurde dieses 30 Minuten lang bei 10 bis 30°C in 400 µl einer Substratlösung (o-Phenyldiaminlösung, die Wasserstoffsuperoxid enthält) inkubiert. Danach wurde die Reaktion durch Hinzufügen von 3 ml 1,5 N Schwefelsäure beendet. Die Absorption der erhaltenen Lösung wurde zur Bestimmung der Enzymaktivität des an das Hohlkügelchen gebundenen Enzyms bei 492 nm gemessen.

5

Die Enzymaktivitäten im Falle der Human-TSH Standardlösungen mit jeweils 25, 5, 2,5 und 0 IU/ml wurden in der gleichen Weise gemessen, um eine Standardkurve zur Bestimmung des Human-TSH, gezeigt in Fig. 4, erstellt.

Die Ergebnisse der Human-TSH Bestimmung werden in Tabelle 2 gezeigt.

10

Vergleichsbeispiel 3 (Bestimmung des TSH durch die Sandwich-Methode)

a) Herstellung der Human-TSH Standardlösung

Beispiel 1, a) wurde wiederholt.

15

b) Herstellung des Anti-TSH monoclonal Immunoglobulin

Beispiel 2, b) wurde wiederholt.

20

c) Herstellung des peroxidasemarkierten anti-TSH monoclonal Immunoglobulin

Das oben erwähnte anti-TSH monoclonal Immunoglobulin wurde mit Peroxidase in der gleichen Weise, wie in Beispiel 1c) beschrieben, gekoppelt und die erhaltene Lösung 1/10 – 1/5000 mit einem 1% Rinderserumalbumin enthaltenden Puffer verdünnt.

25

d) Herstellung der mit anti-TSH polyclonalen Antikörpern überzogenen Glashohlkügelchen

Beispiel 2c) wurde wiederholt.

30

e) Quantitative Bestimmung des Human-TSH

Ein mit anti-TSH polyclonalen Antikörpern überzogenes Glashohlkügelchen und 100 µl einer 50 IU/ml human TSH enthaltenden Standardlösung wurden 60 Minuten lang bei 37°C mit 200 µl eines 0,02 M Phosphatpuffers, der 10 bis 100 µg anti-TSH polyclonale Antikörper enthält, in einem Teströhrchen inkubiert und anschließend das Hohlkügelchen mit destilliertem Wasser gewaschen. Danach wurde das Hohlkügelchen in 300 µl einer Lösung aus peroxidasemarkierten anti-TSH monoclonal Immunoglobulin eingebracht und anschließend 60 Minuten lang bei 37°C inkubiert. Nachdem das Hohlkügelchen ein weiteres Mal mit destilliertem Wasser gewaschen wurde, wird dieses 30 Minuten lang bei 37°C in 400 µl einer Substratlösung (o-Phenyldiaminlösung, die Wasserstoffsuperoxid enthält) inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Hinzufügen von 3 ml 1,5 N Schwefelsäure beendet. Die Absorption der erhaltenen Lösung wurde zur Bestimmung der Enzymaktivität des an das Hohlkügelchen gebundenen Enzyms bei 492 nm gemessen.

35

Die Enzymaktivitäten im Falle der Human-TSH Standardlösungen von jeweils 25, 5, 2,5 und 0 IU/ml wurden in der gleichen Weise gemessen, um eine Standardkurve zur Bestimmung des Human-TSH, dargestellt in Fig. 5, zu erstellen.

40

Die Ergebnisse der Human-TSH-Bestimmung werden in Tabelle 2 gezeigt.

Vergleichsbeispiel 4 (Bestimmung des TSH durch ein Verfahren aufeinanderfolgender Reaktionen)

50

a) Herstellung der Human-TSH Standardlösung

Beispiel 2, a) wurde wiederholt.

55

b) Herstellung des Anti-TSH monoclonal Immunoglobulins

Beispiel 2, b) wurde wiederholt.

c) Herstellung der mit anti-TSH polyclonalen Antikörpern überzogenen Glashohlkügelchen

60

Beispiel 2, c) wurde wiederholt.

d) Quantitative Bestimmung des Human-CEA

65

Ein mit Kaninchen anti-TSH polyclonalen Antikörpern überzogenen Glashohlkügelchen und 100 µl einer 50 IU/ml enthaltenden human TSH Standardlösung wurde 30 Minuten lang bei 37°C mit 0,02 M Phosphatpuffer in einem Teströhrchen inkubiert und anschließend das Hohlkügelchen mit destilliertem Wasser gewaschen.

Dann wurde das Hohlkugelchen in 300 µl eines 0,02 M Phosphatpuffers, der 10 bis 100 µg/ml des anti-TSH monoklonalen Antikörpers enthält, eingebracht und anschließend 30 Minuten lang bei 37°C inkubiert. Nach Waschen des Hohlkugelchens mit destilliertem Wasser wurde dieses in 300 µl einer Lösung aus einem peroxidasemarkierten anti-Mausimmunoglobulin Antikörper gegeben und anschließend 30 Minuten lang bei 37°C inkubiert. Nach weiterem Waschen mit destilliertem Wasser wurde das Hohlkugelchen in 400 µl einer Substratlösung (*o*-Phenyldiaminlösung, die Wasserstoffsuperoxid enthält) inkubiert. Anschließend wird die Reaktion durch Hinzufügen von 3 ml 1,5 N Schwefelsäure beendet. Die Absorption der erhaltenen Lösung wird zur Bestimmung der Enzymaktivität des an das Hohlkugelchen gebundenen Enzyms bei 492 nm gemessen.

Die Enzymaktivitäten im Falle der Human-TSH Standardlösungen von jeweils 25, 5, 2,5 und 0 IU/ml wurden in der gleichen Weise gemessen, um eine Standardkurve zur Bestimmung von Human-TSH, dargestellt in Fig. 6, zu erstellen.

Die Ergebnisse der Bestimmung des Human-TSH werden in Tabelle 2 gezeigt.

Tabelle 2

	Empfindlichkeit IU/ml	Testbereich IU/ml	Präzision IU/ml (Variationskoeffizient,%)	IU/ml (Variationskoeffizient,%)
Beispiel 2	2,0	0—50	2,8 ± 0,2 (7,1%)	26,0 ± 1,4 (5,4%)
Vergleichsbeispiel 3	6,5	0—50	2,6 ± 0,7 (26,9%)	25,5 ± 4,3 (16,9%)
Vergleichsbeispiel 4	5,7	0—50	3,0 ± 0,6 (20,0%)	28,2 ± 4,7 (16,6%)

Das erfindungsgemäße EIA hat auch im Falle eines geringen Titers des zweiten Antikörpers eine ausreichend hohe Empfindlichkeit, wohingegen die EIA-Sandwich- und die EIA-Methode mit drei aufeinander folgenden Immunreaktionen eine schlechte Empfindlichkeit, insbesondere, wenn der Titer des zweiten Antikörpers gering ist, aufweisen. Die Erfindung stellt auch für den Fall, daß der zweite Antikörper ungereinigt ist, wie beispielsweise bei Antiseren, Kultur- oder Ascitesflüssigkeiten, eine hohe Empfindlichkeit bereit. Zusätzlich kann eine hohe Empfindlichkeit erfindungsgemäß erhalten werden, wenn als zweiter Antikörper ein monoklonaler Antikörper verwendet wird, wobei monoklonale Antikörper im allgemeinen eine hohe Spezifität, aber eine geringe Affinität und deshalb geringe Empfindlichkeit aufweisen. Demzufolge kann eine hochspezifische Bestimmung mit einer hohen Empfindlichkeit erfindungsgemäß durch Verwendung eines monoklonalen Antikörpers als zweiten Antikörper erzielt werden. Damit ist die vorliegende Erfindung als diagnostisches Mittel für CEA, TSH, HCG-beta und HBs Antigene, für deren Bestimmung eine hohe Empfindlichkeit verlangt wird, besonders geeignet.

45

50

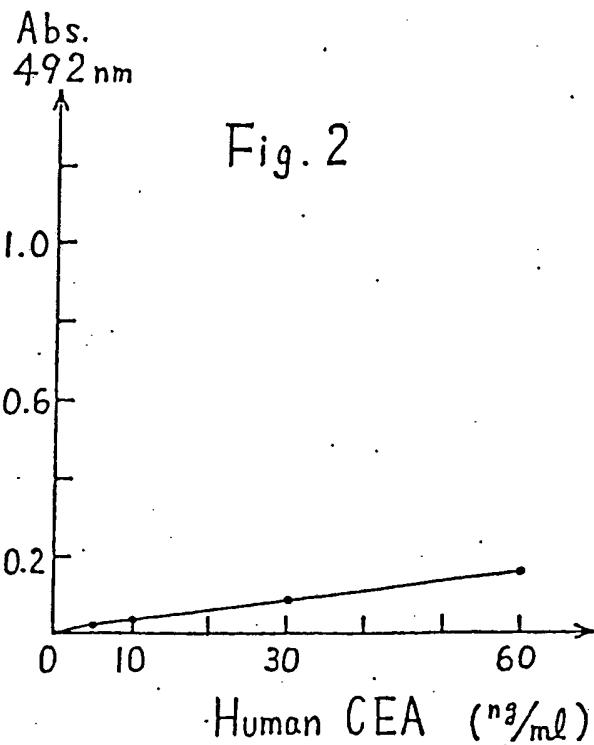
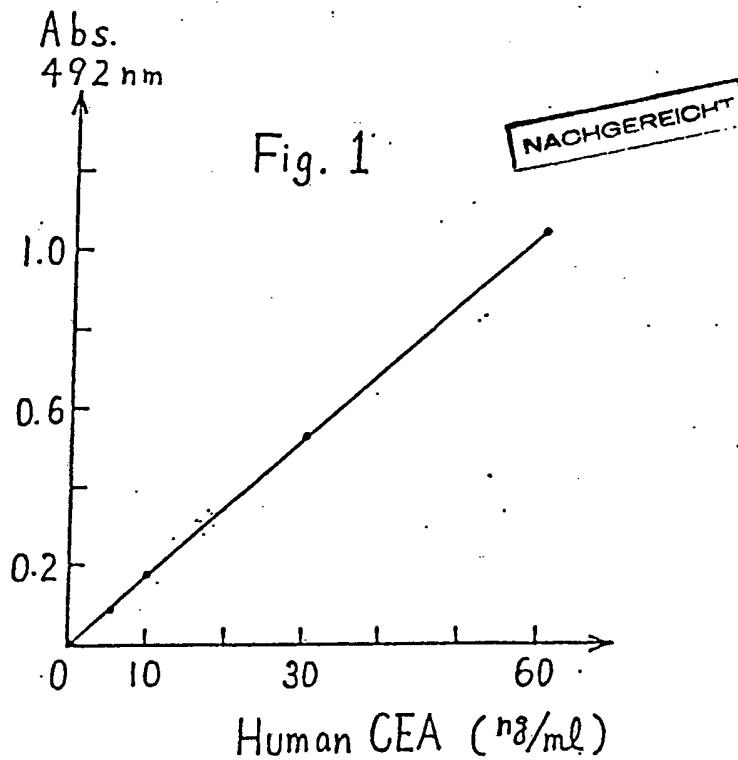
55

60

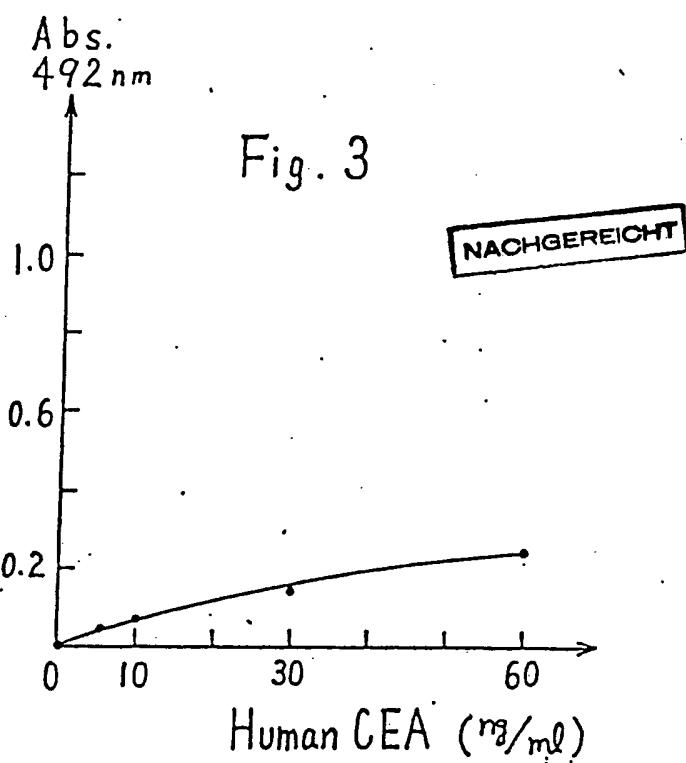
65

3715984

Nummer: 37 15 984
Int. Cl. 4: G 01 N 33/535
Anmeldetag: 13. Mai 1987
Offenlegungstag: 19. November 1987

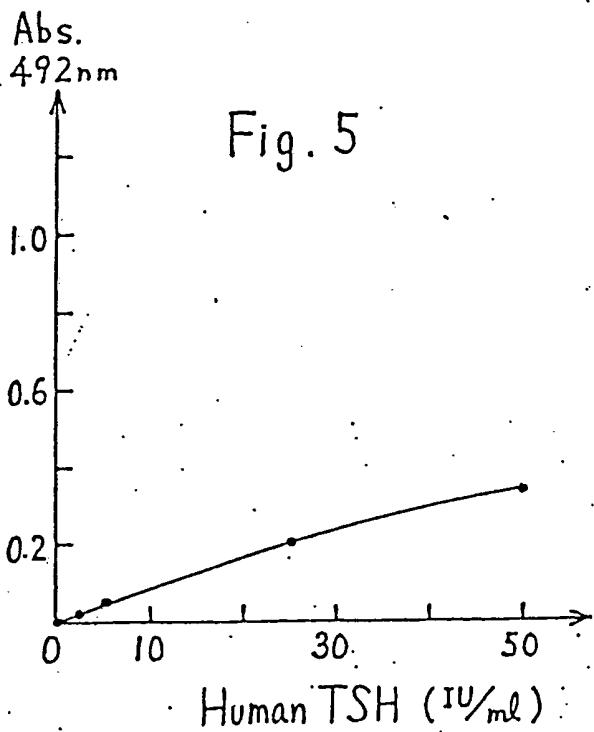
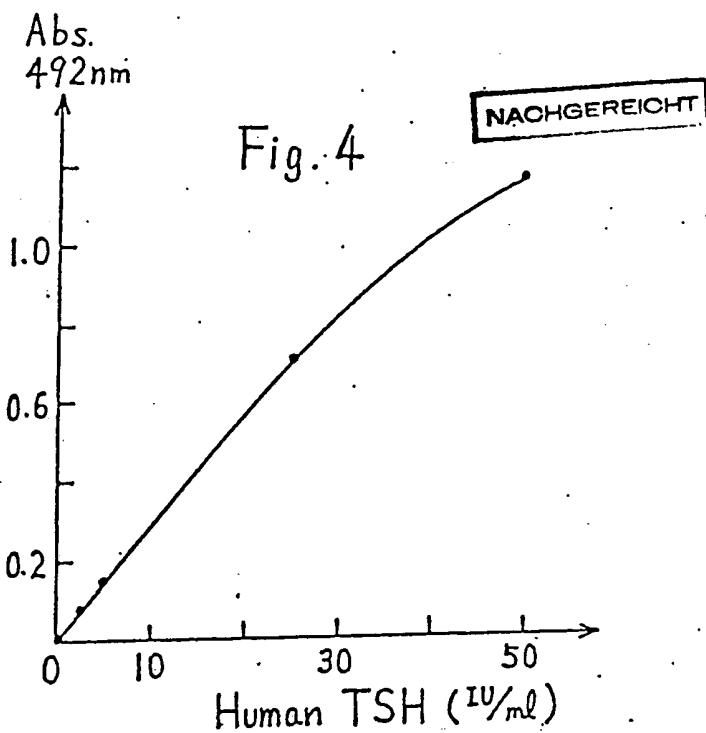


708 847/607

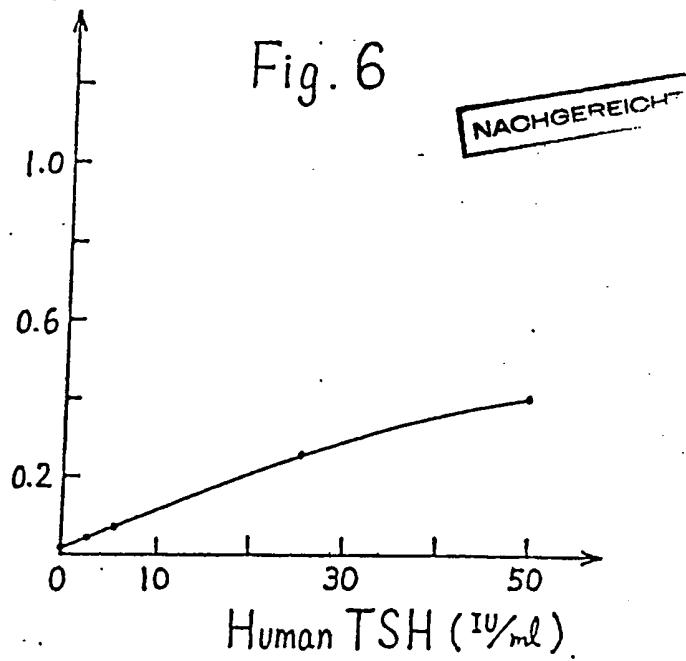


ORIGINAL INSPECTED

3715984



Abs.
492nm



ORIGINAL INSPECTED